

10/534800

Rec'd PCT/PTO

12 MAY 2003

PCT/JP03/12500

30.09.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

FLZ

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月29日

出願番号
Application Number: 特願2002-346728
[ST. 10/C]: [JP 2002-346728]

REC'D 13 NOV 2003	
WIPO	PCT

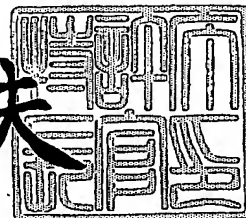
出願人
Applicant(s): 村口 篤
岸 裕幸
民谷 栄一
鈴木 正康

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3090328

【書類名】 特許願

【整理番号】 A25116H

【提出日】 平成14年11月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市明輪町1-108-1301

【氏名】 村口 篤

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町2556-4-3-101

【氏名】 岸 裕幸

【発明者】

【住所又は居所】 石川県金沢市平和町3-17-14 平和宿舎C 58
棟13号

【氏名】 民谷 栄一

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市長江本町18-4-54

【氏名】 鈴木 正康

【特許出願人】

【識別番号】 502413278

【氏名又は名称】 村口 篤

【特許出願人】

【識別番号】 502413289

【氏名又は名称】 岸 裕幸

【特許出願人】

【識別番号】 395015227

【氏名又は名称】 民谷 栄一

【特許出願人】

【識別番号】 502345407

【氏名又は名称】 鈴木 正康

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】抗原特異的リンパ球抗原受容体遺伝子のクローニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】ある抗原に特異的に反応するリンパ球（以下、抗原特異的リンパ球という）を 1 個選択し、次いでこの 1 個の抗原特異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法。

【請求項 2】前記 1 個の抗原特異的リンパ球の選択は、1 個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次いで、抗原に反応したリンパ球を検出し、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】抗原特異的リンパ球は、頻度が 0. 1 % 以下である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】抗原特異的リンパ球を、細胞溶解剤を用いて溶解し、R T - P C R を用いて抗原特異的抗原受容体遺伝子を増幅する請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】R T - P C R が、逆転写酵素による c D N A 調製の後、抗原受容体遺伝子用のプライマーミックスを用いて P C R を 2 回行うことにより行う請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】抗原特異的リンパ球が B リンパ球または T リンパ球である請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】抗原特異的抗原受容体遺伝子が、抗原特異的リンパ球が B リンパ球である場合には免疫グロブリン遺伝子であり、T リンパ球である場合には T 細胞受容体遺伝子である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】抗原特異的リンパ球が B リンパ球であり、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子がクローニングされる請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】抗原特異的リンパ球が T リンパ球であり、抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子がクローニングされる請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】遺伝子を増幅を、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェ

ルから取り出すことなく、マイクロウェル中で行う請求項 2～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】請求項 8 に記載の方法によりクローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項 12】請求項 9 に記載の方法によりクローニングされた抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原特異的リンパ球抗原受容体遺伝子のクローニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、抗原特異的リンパ球は図 6 に示すような 96 穴プレートを用いて、1 穴あたり約 200,000 個のリンパ球を加えて 3 日から 1 週間、抗原の存在下で培養することにより検出していた（非特許文献 1 及び 2）。

検出方法は

1. 細胞の増殖（ ^3H -thymidine の取り込み、生細胞の検出）
2. 抗体・サイトカインの産生

を測定することによる。

この方法では集団の中に抗原特異的リンパ球が存在することは確認できた。しかし、個々の抗原特異的リンパ球を同定することはできなかった。

【0003】

これに対して近年、蛍光色素で標識した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に蛍光標識抗原を結合させ、蛍光標識抗原を結合したリンパ球を、フローサイトメータを用いることにより検出する方法が開発され利用されている（非特許文献 3）。この方法では抗原に結合するリンパ球を同定することが可能である。さらに抗原に結合するリンパ球を分取することも可能である。

【0004】

しかしながら、上記検出方法では、分取するためにはセルソーターという高価で複雑な機器が必要である上に、以下の問題も有る。

(1) 分取するための機器の条件設定が難しく、細胞を分取するためには機器操作の熟練を要する。

(2) バックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合には抗原特異的リンパ球を検出できない。

(3) 細胞を分取する効率は低い。

(4) 細胞を分取するのに時間がかかる。

(5) 抗原が結合することは確認できるが、抗原が結合したリンパ球の反応を解析することは難しい。

【0005】

別の抗原特異的リンパ球検出法として、磁気ビーズに結合した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に磁気ビーズ結合抗原を結合させ、磁石を用いて抗原特異的リンパ球を分取する方法も開発されている（非特許文献4）。

この方法では、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認できる。しかし、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することはできなかった。また、蛍光色素標識抗原・セルソーターを用いた方法と同様にバックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合には抗原特異的リンパ球を検出することが難しかった。

【0006】

従来の抗原特異的抗体遺伝子のクローニング方法として、以下の方法が知られている。

(1) 人の場合、末梢Bリンパ球をEBウィルスで形質転換させ株化して抗原特異的抗体を産生している細胞をスクリーニングし、得られた抗原特異的リンパ球細胞株から抗体遺伝子のクローニング方法がある（非特許文献5、6）。この方法の場合、抗原特異的リンパ球細胞株をスクリーニングするのが非効率的であり、かつ細胞培養に1カ月程度かかることから時間がかかり、面倒である。マウ

スの場合はハイブリドーマを作製することができるが、人の場合は効率のよいハイブリドーマの系は作成されていない。

【0007】

(2) 別の方法として、バクテリオファージを用いて抗原特異的抗体遺伝子をクローニングする方法がある(非特許文献7)。この場合、人のリンパ球より mRNA を抽出し、免疫グロブリンの H 鎖と L 鎖の cDNA ライブラリーをそれぞれ作製し、一つのファージ DNA に組み込むことにより、ファージで抗体の H 鎖と L 鎖を発現させる。この H 鎖と L 鎖の組合せで抗原特異性が決まる。しかし、この系の場合、その組合せはランダムであり、抗原を使ってその抗原に結合する抗体を作っているファージをスクリーニングする。その結果、抗原に結合する抗体を作っているファージが得られれば、抗原特異的抗体遺伝子がクローニングである。しかし、H 鎖と L 鎖の組合せはランダムなので抗原特異的抗体遺伝子のスクリーニングは非常に非効率的である。例えば、ある抗原に対する抗体の H 鎖の cDNA と L 鎖の cDNA がライブラリーの中に 10^4 乗分の 1 の頻度でそれぞれ存在しているとすると、その抗原に結合できる H 鎖と L 鎖の組合せは 10^8 乗分の 1 になる。また、この系の場合、得られた H 鎖と L 鎖の組合せが、実際にヒトの体の中でつくられている H 鎖と L 鎖の組合せと同じであるかどうか分からない。

【0008】

【非特許文献 1】「リンパ球機能検索法」矢野純一、藤原道夫編著、中外医学社(1994 年)

【非特許文献 2】「免疫実験操作法 I、II」右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之編集、南江堂(1995 年)

【非特許文献 3】Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274:94-96, 1996

【非特許文献 4】Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H, CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journa

l of Immunological Methods 125:19-28, 1989.

【非特許文献 5】Roome AJ, Reading CL. The use of Epstein-Barr virus transformation for the production of human monoclonal antibodies. Exp Biol 43:35-55, 1984

【非特許文献 6】Carson DA, Freimark BD. Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies. Adv Immunol. 38:275-311, 1986

【非特許文献 7】Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 85:5879-5883, 1988.

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、従来の抗原特異的抗体遺伝子のクローニング方法は、非常に効率の悪い方法であった。それでも、頻度が比較的高い抗原特異的リンパ球については、従来の方法でも、相当量の労力を投入すれば、抗原特異的抗体遺伝子をクローニングすることは可能であった。しかし、従来の方法では頻度の低い抗原特異的リンパ球を同定、選別するということは不可能であった。

【0 0 1 0】

そこで本発明は、頻度が比較的高い抗原特異的リンパ球は勿論のこと、頻度の低い抗原特異的リンパ球であっても、簡便に特定の抗原に特異的に反応するリンパ球を選択し、この選択された抗原特異的リンパ球から、抗原特異的抗原受容体遺伝子を効率的なクローニング方法を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、クローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子からモノクローナル抗体を製造する方法を提供すること、及びクローニングされた抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法を提供することも目的とする。

【0 0 1 1】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するための本発明は以下の通りである。

(1) ある抗原に特異的に反応するリンパ球（以下、抗原特異的リンパ球という）を1個選択し、次いでこの1個の抗原特異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法。

(2) 前記1個の抗原特異的リンパ球の選択は、1個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次いで、抗原に反応したリンパ球を検出し、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより行う(1)に記載の方法。

(3) 抗原特異的リンパ球は、頻度が0.1%以下である(1)に記載の方法。

(4) 抗原特異的リンパ球を、細胞溶解剤を用いて溶解し、RT-PCRを用いて抗原特異的抗原受容体遺伝子を増幅する(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) RT-PCRが、逆転写酵素によるcDNA調製の後、抗原受容体遺伝子用のプライマーミックスを用いてPCRを2回行うことにより行う(4)に記載の方法。

(6) 抗原特異的リンパ球がBリンパ球またはTリンパ球である(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 抗原特異的抗原受容体遺伝子が、抗原特異的リンパ球がBリンパ球である場合には免疫グロブリン遺伝子であり、Tリンパ球である場合にはT細胞受容体遺伝子である(6)に記載の方法。

(8) 抗原特異的リンパ球がBリンパ球であり、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子がクローニングされる(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9) 抗原特異的リンパ球がTリンパ球であり、抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(10) 遺伝子の増幅を、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことなく、マイクロウェル中で行う(2)～(9)のいずれかに記載の方法。

(11) (8)に記載の方法によりクローニングされた抗原特異的免疫グロブリン

ン遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造する方法。

(12) (9)に記載の方法によりクローニングされた抗原特異的T細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法。

【0012】

【発明の実施の態様】

本発明のクローニング方法は、ある抗原に特異的に反応するリンパ球（抗原特異的リンパ球）を1個選択し、次いでこの1個の抗原特異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法である。

本発明のクローニング方法は、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下である場合に特に有効である。

しかし、頻度が0.1%を超える場合にも適用できることは勿論である。

抗原特異的リンパ球は、例えば、Bリンパ球またはTリンパ球であることができる。さらに、抗原特異的抗原受容体遺伝子は、抗原特異的リンパ球がBリンパ球である場合には免疫グロブリン遺伝子であり、Tリンパ球である場合にはT細胞受容体遺伝子である。

【0013】

血液中のリンパ球は1個1個がそれぞれ別々の抗原に反応する。そこで、本発明では、例えば、抗原に特異的に反応したBリンパ球を検出し、このBリンパ球から、抗原（病原体）に反応する免疫グロブリン（抗体）遺伝子をRT-PCRにより増幅できる。同様に、抗原に特異的に反応したTリンパ球を検出し、このTリンパ球から、抗原（病原体）に反応するT細胞受容体遺伝子をRT-PCRにより増幅できる。

【0014】

〔抗原特異的リンパ球の選択〕

1個の抗原特異的リンパ球の選択は、例えば、マイクロウェルアレイチップを用いた方法により行うことができる。マイクロウェルアレイチップを用いた方法では、例えば、1個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次いで、抗原に反応したリンパ球を検出し、検出された抗原特異的リ

ンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより、1個の抗原特異的リンパ球を得ることができる。この方法について、より具体的に説明する。

【0015】

(マイクロウェルアレイチップ)

マイクロウェルアレイチップとしては、複数のマイクロウェルを有し、かつ各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことができるものを使用することができる。各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことで、抗原特異的リンパ球を細胞レベルで特定することが可能になる。即ち、このマイクロウェルアレイチップを用いると、マイクロウェルに含まれる被検体リンパ球が1個であることから、抗原に反応する被検体リンパ球を1個の細胞として特定でき、結果として、抗原特異的リンパ球を1個の細胞として検出できる。そして、検出された1個の抗原特異的リンパ球を取り出して、遺伝子をクローニングする。

【0016】

但し、同一のマイクロウェルには、リンパ球以外の細胞が被検体リンパ球とともに含まれていても良い。リンパ球以外の細胞であれば、抗原に反応せず、検出されることもないからである。

【0017】

マイクロウェルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウェルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、直方体、逆円錐型等であることもできる。また、円筒形のマイクロウェルの寸法は、例えば、直径5~100 μ m、好ましくは5~15 μ mであり、深さ5~100 μ m、好ましくは5~30 μ mであることができる。

1つのマイクロウェルアレイチップが有するマイクロウェルの数は、特に制限はないが、抗原特異的リンパ球の頻度が 10^5 個に1個から多い場合には約500個であるという観点から、1cm²当たり、例えば、2,000~100,000個の範囲であることができる。

【0018】

マイクロウェルには、被検体リンパ球は培養液とともに格納されている。培養液としては、例えば、以下のものを挙げることができる。

1. 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mg/ml グルコース, 1mg/ml BSA, 20mM HEPES (pH7.4)
2. 10% FCS(牛胎仔血清)含有RPMI1640培地
3. 1mg/ml BSA含有RPMI1640培地
4. 10% FCS(牛胎仔血清)含有Dulbecco's MEM培地
5. 1mg/ml BSA含有Dulbecco's MEM培地

【0019】

被検体リンパ球は血液由来であることができ、例えば、Bリンパ球またはTリンパ球であることができる。それ以外に扁桃腺(リンパ節)、脾臓等のリンパ組織由来リンパ球、がん浸潤リンパ球などの病変部位浸潤リンパ球等を挙げることができる。

【0020】

(抗原特異的リンパ球の検出方法)

抗原特異的リンパ球の検出方法は、上記マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む。

【0021】

各マイクロウェルへの抗原の添加は、以下のように行うことができる。

1. ピペットを用いてマイクロウェルアレイチップ全面を覆うように抗原液を添加する。
2. 1ウェルずつ自動スポッターを用いて抗原液を添加する。

【0022】

この方法により検出される抗原には、特に制限はないが、例えば、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、または糖鎖等であることができる。また、抗原は、細菌、ウイルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲン等であることができる。

【0023】

細胞の培養は、例えば、リンパ球を培養液に懸濁させ、ウェルに分注後、室温あるいは37℃にて、空気中あるいはCO₂インキュベータ内にて培養することで

行うことができる。

【0024】

抗原に反応する細胞の検出は、以下のように行うことができる。

例えば、Bリンパ球の抗原受容体（免疫グロブリン）に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、抗体産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。あるいは、例えば、Tリンパ球の抗原受容体に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、サイトカイン産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、サイトカイン産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。

【0025】

細胞内シグナル伝達を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞内Ca²⁺イオンの濃度変化をCa²⁺イオン依存性の蛍光色素を用いることにより行うことができる。

細胞内Ca²⁺イオン濃度変化は、蛍光色素としてFura-2あるいはFluo-3を用い、検出装置として蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイリーダーを用いる。

【0026】

具体的には、図1に示すように、Bリンパ球にCa²⁺イオン依存性蛍光色素であるFura-2あるいはFluo-3を導入する。次いで抗原でBリンパ球を刺激すると、細胞内Ca²⁺イオン濃度が上昇する。その結果、Ca²⁺イオンがCa²⁺イオン依存性蛍光色素に結合し、蛍光強度が増強される。Ca²⁺イオン濃度が低いと青っぽい色、高いと赤っぽい色で示されている。この方法では、抗原で刺激されることにより細胞内Ca²⁺イオンが上昇したBリンパ球（抗原特異的）を、マイクロウェルアレイチップを用いて検出できる。

【0027】

細胞増殖を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞数を、生細胞特異的蛍光色素を用いて計測することによっても行うことができる。

。この方法は、具体的には、抗原でBリンパ球を刺激しCO₂インキュベータ内にて37℃、3日間培養すると、細胞が増殖する。細胞が増殖後、培養液中にフルオレッセイン・ジアセテート(Fluorescein diacetate(FDA))あるいはカルボキシ・フルオレッセイン・ジアセテート・スクシンイミジル・エステル(Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester(CFSE))溶液を加える。これらの試薬は生細胞の膜を透過し、細胞内でエステラーゼによって分解され、膜不透過性の蛍光色素を生成する。この蛍光色素の発光は細胞数に比例するためウェル内の生細胞が発光する蛍光強度の和を蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイリーダーを用いて計測することにより生細胞数を測定する。

【0028】

抗体産生を計測することによっても、抗原に反応する細胞の検出を行うことができる。抗体産生は抗体を免疫化学的に計測することにより検出できる。

具体的には、抗原でBリンパ球を刺激しCO₂インキュベータ内にて37℃、1週間培養すると、抗体が培養液中に分泌される。培養液中に分泌された抗原特異的抗体をELISA法(酵素標識免疫吸着法)により検出する。

尚、この検出方法では、マイトゲン、レクチン、抗体、サイトカイン、PMA、Caイオノフォアを用いても、シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を検出することができる。

【0029】

以下に、蛍光色素を用いる方法におけるマイクロウェルアレイチップへの細胞の分注、抗原刺激、取り出しまでについて図2に基づいて説明する。

(1) 細胞の分注

ウェル1つずつに細胞を入れる。

ウェルに入れる細胞は、末梢血からリンパ球画分を分離後、Bリンパ球画分をさらに分離精製して得られる。

次に、Fluo 3/AM(2μM)溶液に細胞を懸濁させ、室温に30分置き、さらに緩衝液で細胞を洗浄し、細胞内に負荷されなかった色素を除去する。

色素を除去した細胞をマイクロウェルに分注する。

マイクロウェルアレイチップの両側にシールを貼り、その上にカバーガラスを

乗せ、緩衝液を満たすことで、乾燥を防ぐ。

【0030】

(2) 蛍光測定

まず、未刺激の細胞の蛍光を測定する。その際の蛍光強度(A)を測定する。

次いで抗原溶液をスライドガラスとカバーガラスの隙間に流し入れ緩衝液と交換し、抗原による刺激を受けた細胞の蛍光を測定する。刺激後1～2分後の蛍光強度(B)を測定する。刺激前後の蛍光強度比(B/A)の高いウェルの細胞を選別する。

【0031】

(3) 抗原刺激に反応した細胞の取り出し

スライドガラスとカバーガラスの隙間に空気を入れると、カバーガラスは容易に剥がれる。抗原刺激により反応した細胞を、未刺激の細胞の蛍光強度と抗原による刺激を受けた細胞の蛍光強度の比(B/A)により選別し、取り出す。

但し、選別(検出)された抗原特異的リンパ球は、マイクロウェルから取り出すことなく、そのままマイクロウェル中で行う、次の遺伝子増幅に供することもできる。

【0032】

(遺伝子増幅)

取り出された抗原特異的リンパ球は、細胞溶解剤を用いて溶解した後、RTPCRを用いて、抗原特異的リンパ球がBリンパ球であれば抗原特異的免疫グロブリン(抗体)遺伝子がクローニングされ、抗原特異的リンパ球がTリンパ球であれば抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる。

細胞溶解剤としては、公知の物をそのまま使用でき、例えば、以下のものを挙げることができる。

1x 1st strand buffer [GIBCO-BRL, SuperScriptIIに添付されている], 0.2 mM dNTP, 0.25% NP-40, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM DTT, Random Primer 0.05 μ M, 1U/ μ L RNasin

【0033】

Bリンパ球における抗原受容体遺伝子は抗体遺伝子と同一のものであり、タン

パク質としては免疫グロブリンと呼ばれる。抗原受容体はBリンパ球の膜表面に存在し（膜型免疫グロブリン）、抗体は普通分泌蛋白（分泌型免疫グロブリン）として産生される。その違いはタンパク質のC末端側にある。膜型免疫グロブリンは細胞膜に埋もれる膜ドメインおよび細胞質側につきでる部分を持っている。分泌型免疫グロブリンも同じ遺伝子から産生される。しかし、オルタナティブ・スプライシング（alternative splicing）によりタンパク質のC末端側が膜型免疫グロブリンと異なり膜ドメインを持たない。その結果、分泌蛋白として産生される。しかし、この二つの蛋白の抗原結合部位は同一である。したがって、Bリンパ球の場合、抗体遺伝子のクローニングと抗原受容体遺伝子のクローニングは同じである。

【0034】

Tリンパ球の場合は、抗原受容体の分泌型というものはない。従って、抗原受容体遺伝子をクローニングすることになる。Tリンパ球の場合にはBリンパ球で設計したプライマーと同じ考え方でプライマーを設計する。これは、Tリンパ球の抗原受容体（TCR）の遺伝子構成はBリンパ球の免疫グロブリン遺伝子の遺伝子構成とほとんど同じだからである。そのため、同じ考え方でプライマーを設計することができる。したがって、抗体遺伝子がクローニングできれば、ほとんど同じ方法でTCR遺伝子もクローニングすることができる。

【0035】

以下、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子の増幅を例にさらに説明する。

取り出された抗原特異的リンパ球を細胞溶解剤で溶解して得られた溶液を用い、逆転写酵素によるcDNAの調製を行う。次いで、免疫グロブリン遺伝子用のプライマーミックスを用いて2回PCRすることにより、所望の抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を増幅（クローニング）することができる。

【0036】

逆転写酵素によるcDNAの調製は、常法（例えば、Sambrook J, Russell DW in Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)）により行うことができる。

本発明では細胞から抽出・精製したRNAを用いてRT反応をするのではなく

、細胞溶解液を用いて直接 R T 反応を行うことが適当である。

【0037】

(PCR法による抗体遺伝子の増幅)

PCR法による抗体遺伝子の増幅では、PCR反応を2回実施することにより抗体遺伝子のV領域遺伝子を増幅することが適当である。

抗体分子はH鎖およびL鎖の組合せによりできており、ヒト抗体遺伝子のH鎖は生殖細胞系列では約200種類のV領域遺伝子断片、約20種類のD断片、6種類のJ断片より構成されており、Bリンパ球に分化するときに遺伝子再構成より各々1種類のV断片、D断片、J断片が組み合わさることにより(V/D/J再構成)ひとつの抗原結合部位を形成する。L鎖も同様である。

各Bリンパ球は細胞表面に1種類の抗体分子を発現している。抗原特異的Bリンパ球より抗原特異的抗体遺伝子を増幅するためにはそれぞれのV断片の配列に一致したプライマーを用いる必要がある。

【0038】

抗体分子はH鎖、L鎖それぞれ2本ずつのペプチド鎖からなり、図3に示す構造図の左側のV領域(H鎖はV_H領域、L鎖はV_κあるいはV_λ領域)で抗原と結合する。H鎖及びL鎖のサブファミリーの数を以下の表に示す。

【0039】

【表1】

		V領域	C領域
H鎖		7種類	9種類*
L鎖	κ鎖	7種類	1種類
	λ鎖	11種類	7種類**

【0040】

上記表1に示すように、ヒト抗体遺伝子のH鎖のV領域は7種類のサブファミリーに分類される。サブファミリー内のV断片の配列はよく似ているので共通したプライマーを設定することが可能である。(*C_H領域にはC_γ1~4、C_μ、C_δ、C_α1~2、C_εがあるが、このうち血清中の抗体の主な種類であるIgG、IgMについてプライマーを設計し、PCRに用いた。C_γ1~4については共

通配列 1 種類を用いているために C_{μ} と合わせて 2 種類のプライマーを用いている。****C λ 鎖にはC λ 1～C λ 7鎖があるが、プライマーとしては共通配列の 1 種類を用いている。**)

L 鎖の V 領域および C 領域の各サブファミリーについても同様のことが言えるので、各サブファミリー毎にプライマーを設定し、PCR 反応には、H 鎖あるいは L 鎖の全サブファミリーに対するプライマーをミックスしたプライマーミックスを用いる。即ち、プライマーとしては、H 鎖、L 鎖それぞれの全種類のミックスを用いる。

【0041】

以下のように PCR 反応を 2 回行い、抗体遺伝子を増幅する。

H 鎖及び L 鎖の V 領域のアミノ酸数が 110～120 前後であることから、V 領域の遺伝子は、約 400 bp 程度である。

そこで、図 3 に示すように、1 回目の PCR 反応である PCR 1 では、リーダーシーケンス (L) から C 領域の cDNA が増幅される。

2 回目の PCR 反応である PCR 2 では、PCR 1 の内側 (V 領域の始まりから C 領域の始まり) 約 400 bp の cDNA が増幅される。

そして、2 回目の PCR 反応で増幅した cDNA の配列を分析する。

【0042】

この点に関して、さらに説明する。

本発明において、PCR 1 と PCR 2 とでは、異なる配列のプライマーミックスを用いるのは、以下の理由による。PCR 1 で増幅したものを再度 PCR 2 で増幅するが、PCR 1 の産物は特異的なものばかりでなく、非特異的な増幅産物も含まれている。PCR 2 を同じプライマーで増幅すると特異的な DNA 配列も増幅するが、非特異的な配列も増幅してしまう。そこで、PCR 2 では PCR 1 で増幅する DNA 配列で PCR 1 のプライマーの位置より少し内側の配列をプライマーに用いる。そうすることで、PCR 1 で増幅した非特異的な DNA 配列は増幅せずに、特異的な DNA 配列を増幅できるようになる。尚、このように、特異的な DNA 配列を増幅するためにプライマーを変えて 2 回目の PCR 2 を行うという以外に、1 個の B リンパ球から抗体遺伝子を増幅する場合、1 回の PCR

では増幅が量的に不十分であるという理由からも、PCR反応を2回行うことが適当である。

【0043】

上記方法では、2回目のPCR反応で増幅したcDNAの配列を分析するが、その際、1回目のPCR反応生成物と2回目のPCR反応生成物とは、分離する必要はない。これは、通常、PCR1の産物はPCR2で増幅した産物に較べると無視できる量だからである。

【0044】

抗原特異的リンパ球がTリンパ球である場合には抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされるが、クローニング方法は、上記Bリンパ球の場合と同様に行うことができる。Tリンパ球の抗原受容体(TCR)のサブファミリーを以下の表に示す。

【0045】

【表2】

	V領域	C領域
α 鎖	41種	1種
β 鎖	30種	2種

【0046】

本発明のクローニング方法では、抗原特異的リンパ球がBリンパ球である場合、抗原特異的免疫グロブリン(抗体)遺伝子がクローニングされる。そしてクローニングされた遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造することができる。

クローニングされた遺伝子を用いてのモノクローナル抗体の製造は常法により行うことができ、PCR法で増幅したV領域のcDNAとC領域の遺伝子配列を結合し、発現ベクターを用いて抗体分子を作成する。

モノクローナル抗体の製造は、例えば、Kanda H, Mori K, Koga H, Taniguchi K, Kobayashi H, Sakahara H, Konishi J, Endo K, Watanabe T. Construction and expression of chimeric antibodies by a simple replacement of heavy and light chain V genes into a single cassette vector. 13:359-366, 1994に記載の方法により行うことができる。

【0047】

尚、本発明の方法においては、抗体分子全体を製造する必要はなく、V領域が得られれば良い。また、上記PCR法で得られる遺伝子配列はV領域とC領域の一部である。そこで、モノクローナル抗体の製造方法において発現ベクターに導入する遺伝子は、抗体分子（全体）ではなく、V領域のみまたはV領域+C領域の一部であってもよい。

【0048】

H鎖とL鎖とは、通常は、別々にクローニングする。この場合、RTまでは1本のチューブで反応を行い、以後のPCRではH鎖用とL鎖用の2本のチューブを用いる。H鎖とL鎖を1本のチューブで合成できることもあるが、増幅しやすい方が主に増えてしまうということがしばしば起こるので、確実にH鎖、L鎖を増幅させるという意味から2本のチューブで別々にPCRを行うことが好ましい。

【0049】

抗体を得るには、H鎖とL鎖を両方とも発現させる必要があり、上記発現ベクターにはH鎖とL鎖の両方を入れておく。

その場合、H鎖とL鎖を別々の発現ベクターに挿入し、蛋白を発現させる際に、同じ細胞に両方の発現ベクターを同時に導入することにより、1個の細胞でH鎖とL鎖を発現させるという方法、および、H鎖とL鎖を1つのベクターに同時に挿入した発現ベクターを構築し、それを細胞に導入することにより、H鎖とL鎖を一つの細胞で発現させるという2通りがある。

【0050】

動物細胞に発現ベクターを導入した場合は、産生された抗体はヒトあるいはほ乳類の体の中で作られる抗体と全く同じものになる。大腸菌で作らせた場合は、アミノ酸の配列は上記のものと全く同じだが、糖鎖が結合していないものが作られる。本発明の方法では、産生された抗体がヒトあるいはほ乳類の体の中で作られる抗体と全く同じものになることから、動物細胞で抗体を産生させることが好ましい。

【0051】

本発明のクローニング方法は、抗原特異的リンパ球がTリンパ球である場合、抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる。クローニングされた抗原特異的受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療を行うことができる。例えば、クローニングしたT細胞受容体遺伝子をTリンパ球あるいはTリンパ球前駆細胞に導入してやることにより、病原体等に特異的なT細胞受容体を発現したTリンパ球を人為的に作り出すことができる。このようにして作り出したTリンパ球を免疫機能の低下した患者に投与することにより免疫機能を回復させることが可能となる。

【0052】

【実施例】

以下本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

1. Bリンパ球の分離

末梢血からFicoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いてリンパ球画分を分離し、さらにAutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてリンパ球画分からBリンパ球画分をさらに分離精製する。

【0053】

2. F l u o 3 の細胞への導入 (図1 参照)

2×10^6 個のBリンパ球を $2 \mu\text{M}$ F l u o 3 /AM (同仁、熊本) /loading buffer(137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mg/mLグルコース, 1mg/mL BSA, 20mM HEPES (pH7.4))に懸濁し、室温に30分インキュベーションする。loading bufferで細胞を洗浄し、細胞内に導入されなかったF l u o 3 /AMを除く。その後細胞をRPMI1640/10% F C S溶液に懸濁する。

【0054】

3. マイクロウェルアレイチップ (図2 参照)

マイクロウェルアレイチップはpoly(dimethylsiloxane) (PDMS)を用いて作製されており、直径 $10 \mu\text{m}$ 、深さ $32 \mu\text{m}$ のマイクロウェルが $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ のチップ上に縦・横 $30 \mu\text{m}$ の間隔 (マイクロウェルの中心から中心までの距離は $40 \mu\text{m}$) で配置されている。チップの両側には厚さ1mm幅約1mm長さ2cmのシールを貼る。

【0055】

4. マイクロアレイリーダー

本装置は基本的に日立ソフトウェアエンジニアリング（株）（横浜市）のマイクロアレイリーダー（CRBIO IIe）を用いており、以下の変更を加えている。搭載されているレーザー（Cy3用, 532 nm; Cy5用, 635 nm）のうちの1本を473nmのレーザーと置換してある。

【0056】

5. マイクロウェルアレイチップを用いた活性化Bリンパ球の検出（図2参照）

上記マイクロウェルアレイチップに上記細胞懸濁液を添加し、5分間静置する。マイクロウェルに入らなかった細胞をRPMI1640/10% FCS溶液を用いて洗い流す。リンパ球の直径は約 $10\mu\text{m}$ であり、使用するマイクロウェルの直径が $10\mu\text{m}$ であるためにひとつのマイクロウェルにはリンパ球は1個入る。カバーガラスを上記シールの上に置き、チップとカバーガラスの間にRPMI1640/10% FCS溶液を満たす。このマイクロウェルアレイチップをマイクロアレイリーダーに挿入し、解像度 $10\mu\text{m}$ でスキャンし、データを保存する（抗原刺激前の蛍光のデータ：A）。

【0057】

次に、チップとカバーガラスの間のRPMI1640/10% FCS溶液を除き、そこへRPMI1640/10% FCS溶液に溶解させた抗原（ $10\mu\text{g/mL}$ ）を加える。抗原を加えて1分後にマイクロウェルアレイチップをマイクロアレイリーダーに挿入し、解像度 $10\mu\text{m}$ でスキャンし、データを保存する（抗原刺激後の蛍光のデータ：B）。

【0058】

刺激前後の蛍光強度の比(B/A)を計算し、比の大きいウェルを特定する。このウェルの中に抗原特異的Bリンパ球が存在する。

【0059】

6. マイクロウェルからの細胞の分取。

マイクロマニピュレータを用いてガラスキャピラリーを用いることにより顕微鏡下で細胞を分取する。

【0060】

7. 抗原特異的Bリンパ球からの抗体遺伝子のPCRによる増幅（図3参照）

1 個の抗原特異的 B リンパ球を PCR 用チューブに添加する (5 μ L)。細胞に 15.15 μ L の細胞溶解液 (25 μ L に希釈された時の最終濃度: 1x 1st strand buffer [GIBCO-BRL, SuperScriptII に添付されている], 0.2 mM dNTP, 0.25% NP-40, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM DTT, Random Primer 0.05 μ M, 1U/ μ L RNasin [Promega, Madison, WI]) を加え、そこへ逆転写酵素 SuperScriptII (GIBCO-BRL, Rockville, MD) を (4.85 μ L, 50U) 添加し 37°C、1 時間反応させ mRNA より cDNA を合成する。

【0061】

RT-PCR 反応

Cell sol. (1 cell)	5.0 μ L
1 st strand buffer (5x)	5.0
2.5 mM dNTP	2.0
2.5 % NP-40	2.5
1 mg/ml BSA	2.5
0.1M DTT	2.5
Random primer (50 pmol/ μ L)	0.025
RNase Inhibitor (RNasin 40U/ μ L)	0.625
<u>Super Script II</u>	<u>4.85 (50U)</u>
Total	25.0 μ L
37°C	1 h

上記反応により 1 個のリンパ球の mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を作製する。

【0062】

抗体遺伝子の増幅:

ヒト抗体遺伝子の H 鎖の V 領域は 7 種類のサブファミリーに分類される。サブファミリーの V 断片の配列はよく似ているので共通したプライマーを設定することが可能である。H 鎖および L 鎖の各サブファミリーごとにプライマーを設定し、H 鎖あるいは L 鎖の全サブファミリーに対するプライマーをミックスしたものをを用い、以下のように PCR 反応を 2 回行い、抗体遺伝子を増幅する。

【0063】

PCR 1 の反応は、上記 cDNA 5 μ L を 15 μ L の PCR mix (最終濃度: 1x TAKARA ExTaq buffer, 0.25 mM dNTP, 各サブファミリーに対する Primer 1 0.5 μ M, 0.05U/ μ L ExTaq [Takara, 京都]) に加え、94 $^{\circ}$ C, 3 min; (94 $^{\circ}$ C, 30 sec; 60 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min 30 sec) x 40 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 10 $^{\circ}$ C, ∞ 反応させる。

【0064】

PCR 1

cDNA (上記 RT 反応液)	5.0 μ L
10x ExTaq buffer	2.0
2.5 mM dNTP	2.0
Primer 1 5' Mix (10 μ M each)	1.0
Primer 1 3' Mix (10 μ M each)	1.0
H ₂ O	7.0
<u>Takara ExTaq (0.5 U/μL)</u>	<u>2.0</u>
Total	20.0 μ L

94 $^{\circ}$ C, 3 min.

94 $^{\circ}$ C, 30 sec; 60 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min. 40 cycles

72 $^{\circ}$ C, 5 min.

10 $^{\circ}$ C

PCR 1 の反応により免疫グロブリン (抗体) 遺伝子の Leader 配列から定常部 (C) 領域までの DNA 配列を増幅する。

【0065】

以下に上記反応で用いたプライマー (H鎖用) の配列を示す。

Primer 1 5' Mix (各 10 μ M) (V領域用プライマー)

hVH17a.1 atggactgsayytgagvdtc (SEQ ID No=1)

hVH2a.1 tccacrcctcctgctctgac (SEQ ID No=2)

hVH3a.1 gggcygagstggvtttct (SEQ ID No=3)

hVH4a.1 tcctcctscgtggtggcagct (SEQ ID No=4)
hVH5.1 tcaaccgccatcctcgccct (SEQ ID No=5)
hVH6.1 ctccttctcatcttctctgcc (SEQ ID No=6)
Primer 1 3' Mix (10 μ M each) (C領域用プライマー)
hIGHG1-4out agtccttgaccaggcagccca (SEQ ID No=7)
hIGHMout attctcacaggagacgagggg (SEQ ID No=8)

【 0 0 6 6 】

以下に上記反応で用いたプライマー(L鎖用)の配列を示す。

PCR 1

5' primer

hKV12.1 atgaggstcccygctcagctc (SEQ ID No=9)
hKV3.1 ctcttctcctgctactctggc (SEQ ID No=10)
hKV45.1 ctsttsctytggatctctg (SEQ ID No=11)
hKV6.1 tgggtttctgctgctctggg (SEQ ID No=12)
hKV7.1 atagggtccggggctcctttg (SEQ ID No=13)
hLV12.1 cyktsctcctcactctcctc (SEQ ID No=14)
hLV3.1 ttctcctcctcggcctcctct (SEQ ID No=15)
hLV4.2-2 ccagcytgtgctgactcaate (SEQ ID No=16)
hLV789.2 tcycagmctgtgstgacycag (SEQ ID No=17)
hLV6.1 ttttatgtgactcagcccc (SEQ ID No=18)
hLV7.1 ggcctggactcctctctttctg (SEQ ID No=19)
hLV8.1 ggcctggatgatgttctcctc (SEQ ID No=20)
hLV9.1 tcctctgctcctcaccctcct (SEQ ID No=21)
hLV10.1 cctgggtcatgctcctcctga (SEQ ID No=22)
hLV11.1 gcctgggctccactacttctc (SEQ ID No=23)

3' primer

hIGK1 ctgctcatcagatggcgggga (SEQ ID No=24)
hIGL1 gacacacyagtgtggccttgt (SEQ ID No=25)

【 0 0 6 7 】

P C R 2 の反応は P C R 1 の反応溶液 $2\mu\text{L}$ を $18\mu\text{L}$ の P C R m i x (最終濃度: $1\times$ TAKARA ExTaq buffer, 0.25 mM dNTP, 各サブファミリーに対する Primer2 $0.5\mu\text{M}$, ExTaq $0.05\text{U}/\mu\text{L}$) に加え、 94°C , 3 min ; (94°C , 30 sec ; 60°C , 1 min ; 72°C , $1\text{ min } 30\text{ sec}$) $\times 40\text{ cycles}$; 72°C , 5 min ; 10°C , ∞ 反応させる。

【 0 0 6 8 】

P C R 2

PCR 1 sol.	2.0
10x ExTaq buffer	2.0
2.5 mM dNTP	2.0
Primer 2 5' Mix ($10\mu\text{M}$ each)	1.0
Primer 2 3' Mix ($10\mu\text{M}$ each)	1.0
H ₂ O	10.0
<u>Takara ExTaq ($0.5\text{ U}/\mu\text{L}$)</u>	<u>2.0</u>
Total	20.0

94°C , 3 min .

94°C , 30 sec ; 60°C , 1 min ; 72°C , 1.5 min . 40 cycles

72°C , 5 min .

10°C

P C R 2 の反応により P C R 1 で増幅した免疫グロブリン (抗体) 遺伝子の可変部 (V H) 領域から定常部領域までの DNA 配列を増幅する。

【 0 0 6 9 】

以下に上記反応で用いたプライマー (H鎖用) の配列を示す。

Primer2 Mix

Primer 2 5' Mix ($10\mu\text{M}$ each)

hVH17a.2 ggtgcagctkgtrcartctgg (SEQ ID No=26)

hVH2a.2 caccttgarggagtgctgtcc (SEQ ID No=27)

hVH3a.2 aggtddcarctgktggagtcyg (SEQ ID No=28)

hVH4a.2 ggtcctgtcycagstgcagct (SEQ ID No=29)

hVH5a.2 gtgcagctgggtgcagtctgg (SEQ ID No=30)

hVH6.2 gcagcagtcaggtccaggact (SEQ ID No=31)

Primer 2 3' Mix (10 μ M each)

hIGHG1-4s aagacsgatgggccccttggtg (SEQ ID No=32)

hIGHM aagggttgggcggatgcact (SEQ ID No=33)

【 0 0 7 0 】

以下に上記反応で用いたプライマー (L 鎖用) の配列を示す。

PCR 2

5' primer

hKV1.2 ccagatgacccagttctccatc (SEQ ID No=34)

hKV2.2 ccagtggggatattgtgatgac (SEQ ID No=35)

hKV3.2 cagttctccagccaccctgtct (SEQ ID No=36)

hKV4.2 gtgatgacccagttctccagac (SEQ ID No=37)

hKV 5.2 acactcacgcagttctccagca (SEQ ID No=38)

hKV67.2 ttgtgtgacycagttctccag (SEQ ID No=39)

hLV1.2 agttctgtgtgacgcagccgc (SEQ ID No=40)

hLV23.2 tgactcagccwcyctcmgtgtc (SEQ ID No=41)

hLV4.2-3 caatcatcctctgcmctctgc (SEQ ID No=42)

hLV5.2-2 gactcagccaacctccctctc (SEQ ID No=43)

hLV6.2 gactcagccccactctgtgtc (SEQ ID No=44)

hLV789.2 tcycagmctgtgstgacycag (SEQ ID No=45)

hLV1011.2 tgactcagccmcmctckgtgtc (SEQ ID No=46)

3' primer

hIGK2 gacagatgggtgcagccacagt (SEQ ID No=47)

hIGL2 cttgragctcctcagaggagg (SEQ ID No=48)

【 0 0 7 1 】

P C R 産物を、アガロースゲルを用いて解析、精製し、p T 7 B l u e - T
v e c t o r (Novagen, Madison, WI) にクローニングし、抗体遺伝子配列を決

定した。既存のデータベースに入っている抗体遺伝子の配列と比較したものを図 4 及び 5 に示す。図 4 は L 鎖の配列であり、図 5 は H 鎖の配列である。各図ともに、上側に示した塩基配列が実際に 1 個の B リンパ球から R T - P C R で増幅し、配列決定した抗体遺伝子の配列であり、下側に示した塩基配列がデータベースに登録されていた既存の配列である。

【 0 0 7 2 】

図 4

1st 塩基配列 (配列決定した抗体遺伝子)

File Name: L1 (SEQ ID No=49)

2nd 塩基配列 (既存の配列)

File Name: L33038 (SEQ ID No=50)

図 5

1st 塩基配列 (配列決定した抗体遺伝子)

File Name: H1 (SEQ ID No=51)

2nd 塩基配列 (既存の配列)

File Name: AF062204 (SEQ ID No=52)

【 0 0 7 3 】

図 4 及び 5 中の 94 % および 98 % は、配列決定した抗体遺伝子と既存の配列との相同性を意味する。相同性の値から、配列決定した抗体遺伝子は既存の配列とは異なる抗原に対応した抗体だと推測される。

【 0 0 7 4 】

【発明の効果】

感染症に対しては、病原体特異的リンパ球を検出し、病原体特異的抗体遺伝子をクローニングすることにより、がんに対しては腫瘍特異的リンパ球を検出し、腫瘍特異的抗体遺伝子、腫瘍特異的 T 細胞受容体遺伝子をクローニングすることにより、抗体を用いた抗体療法、また、T 細胞受容体遺伝子を用いた遺伝子治療が可能になると期待される。

【 0 0 7 5 】

自己免疫疾患においては自己反応性リンパ球を検出し、自己抗体、自己抗原特

異的 T 細胞受容体遺伝子をクローニングすることにより、アレルギーにおいてはアレルギー特異的リンパ球を検出し、IgE 遺伝子をクローニングすることにより、正確な病因・病態の把握を行い、病因に対応した治療や治療効果のモニターを行うことができる。

【0076】

さらに、すべてのリンパ球を対象に網羅的に個人の持つすべての抗体遺伝子や T 細胞受容体遺伝子をモニターすることにより、和漢薬の免疫機能に対するモニターや病原体に対する免疫応答を予測することによりテーラーメイド医療に応用することができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Atsushi Muraguchi, Hiroyuki Kishi, Eiichi Tamiya, Masayasu Suzuki

<120> Method of cloning gene of antigen receptor of antigen specific lymphocyte

<130> A25116H

<160> 52

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

atggactgsa yytggagvdt c 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tccacrtcc tgctrctgac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gggcygagst ggvttttyct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tcctcctsc t ggtggcagct 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

tcaaccgcca tcctcgccct 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ctccttcctc atcttcctgc c 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

agtccttgac caggcagccc a 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

attctcacag gagacgaggg g 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

atgaggstcc cygctcagct c 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ctcttcctcc tgctactctg gc 22

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

ctsttsctyt ggatctctg 19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

tgggtttctg ctgctctggg 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

atagggtccg gggctccttt g 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

cykctstcc tcaactctcct c 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ttctcctcct cggcctcctc t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

ccagcytgtg ctgactcaat c 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

tcycagmctg tgstgacyca g 21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

ttttatgctg actcagcccc 20

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ggcctggact cctctctttc tg 22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

ggcctggatg atgcttctcc tc 22

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

tcctctgctc ctcaccctcc t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

cctgggtcat gctcctcctg a 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

gcctgggctc cactacttct c 21

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

ctgctcatca gatggcggga 20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

gacacacyag tgtggccttg t 21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

ggtgcagctk gtrcartctg g 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

caccttgarg gagtctggtc c 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

aggtddcarct gktggagtcy g 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

ggtcctgtcy cagstgcagc t 21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

gtgcagctgg tgcagtctgg 20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

gcagcagtca ggtccaggac t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

aagacsgatg ggcccttggt g 21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

aagggttggg cggatgcact 20

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

ccagatgacc cagtctccat c 21

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

ccagtgggga tattgtgatg ac 22

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

cagtctccag ccaccctgtc t 21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

gtgatgaccc agtctccaga c 21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

acactcacgc agtctccagc a 21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

ttgtgctgac ycagtctcca g 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

agtctgtgct gacgcagccg c 21

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

tgactcagcc wcyctcmgtg tc 22

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

caatcatcct ctgcmtctgc 20

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 43

gactcagcca acctccctct c 21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 44

gactcagccc cactctgtgt c 21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 45

tcycagmctg tgstgacyca g 21

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 46

tgactcagcc mcmctckgtg tc 22

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 47

gacagatggt gcagccacag t 21

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 48

cttgragctc ctcagaggag gg 22

<210> 49

<211> 335

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 49

cagtctccag ccaccctgtc tttgtctcca ggggcaaagt agccaccctc tcctgcnggg 60
ccagtcagag tgtagcanc tacttagcct ggtaccaaca gaaacactgg ccaggctccc 120
aggctcctna tctatgatgc atctcaacag ggccactggc atcccagcca ggttaagtgg 180
cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcancage ctagagcctg aagattntgc 240
agtnattac tgtcancage gtatcaactg gcctctcact ttcggcggag ggaccaaggc 300
tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtc 335

<210> 50

<211> 330

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 50

cagtctccag ccaccctgtc tttgtctcca ggggaaagag ccaccctctc ctgcagggcc 60
agtcagagtg ttagcagcta ctagcctgg taccaacaga aacctggcca ggctcccagg 120
ctctcatct atgatgcac caacagggcc actggcatcc cagccacctt cagtggcagt 180
gggtctggga cagacttcac tctcaccatc agcagcctag agcctgaaga ttttgcagtt 240
tattactgtc agcagcgtag caactgggtg ctactttcg gcggagggac caaggtggag 300
atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 330

<210> 51

<211> 312

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 51

ggtcctgtct caggtgcagc tgcaggcagt cgggccagc gactggtgaa gccttcggag 60
accctgtccc tcacctgcac tgtctctggt ggctccatca gcagtagtag ttactactgg 120
ggctggatcc gccagcccc agggaagggg ctggagtgga ttgggagtat ctattatagt 180
gggagcacct actacaacc gtccctcaag agtcgagtca ccataccgt agacacgtcc 240
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccg cagacacggc tgtgtattac 300
tgtgcgagac ag 312

<210> 52

<211> 310

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 52

ggtcctgtcc cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac 60
cctgtccctc acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg 120
ctggatccgc cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct attatagtgg 180
gagcacctac tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa 240
gaaccagttc tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg 300
tgcgagacag 310

【図面の簡単な説明】

【図 1】 F l u o 3 色素の細胞への導入と。抗原特異的リンパ球の検出。

【図 2】 F l u o 3 色素を導入した細胞のマイクロウェルへの分注。

【図 3】 抗原特異的 B リンパ球からの抗体遺伝子の P C R による増幅。

【図 4】 実施例において得られた抗体(L鎖)遺伝子の配列と既存のデータベース

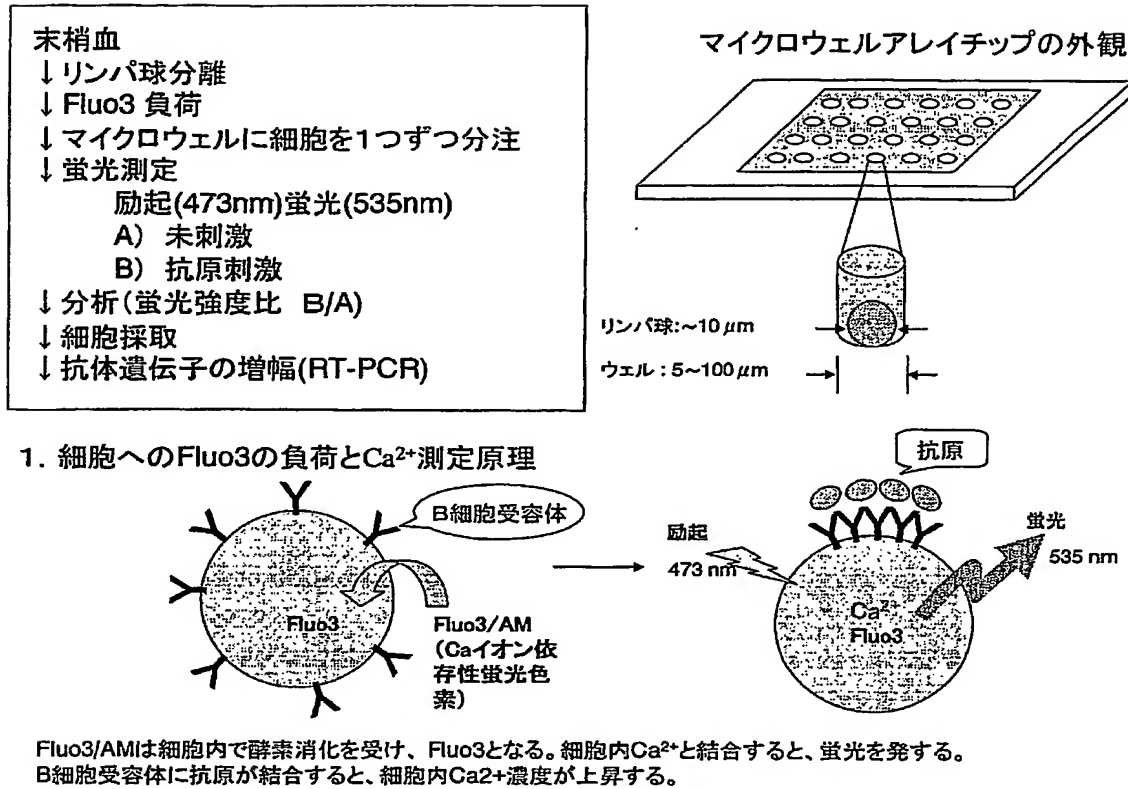
に入っている抗体遺伝子の配列との比較を示す。

【図5】実施例において得られた抗体(H鎖)遺伝子の配列と既存のデータベースに入っている抗体遺伝子の配列との比較を示す。

【図6】従来の抗原特異的リンパ球測定に用いられている96穴プレート。

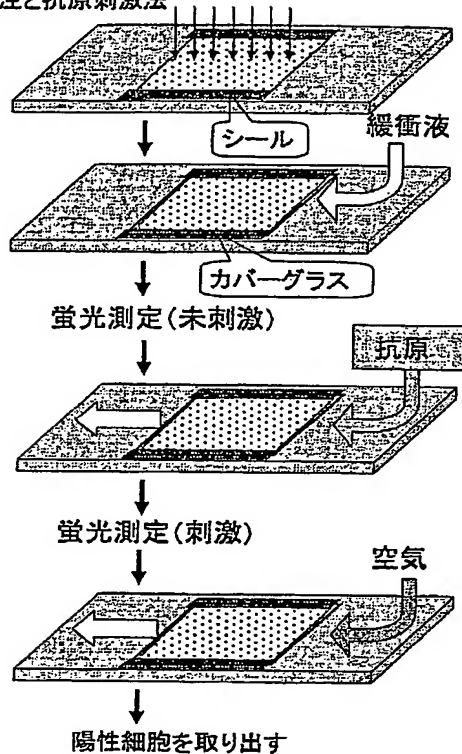
【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

2. 細胞の分注と抗原刺激法



スライドガラス上のマイクロウェルの左右にシールを貼り、ウェルに1つずつFluo3負荷細胞を分注する。

カバーガラスをのせ、緩衝液を満たす。

蛍光強度測定

刺激剤(抗原)を流し入れ、緩衝液と交換する

蛍光強度測定(刺激)、分析

空気を入れることで、スライドガラスは容易に剥がれる。

陽性細胞を取り出す。

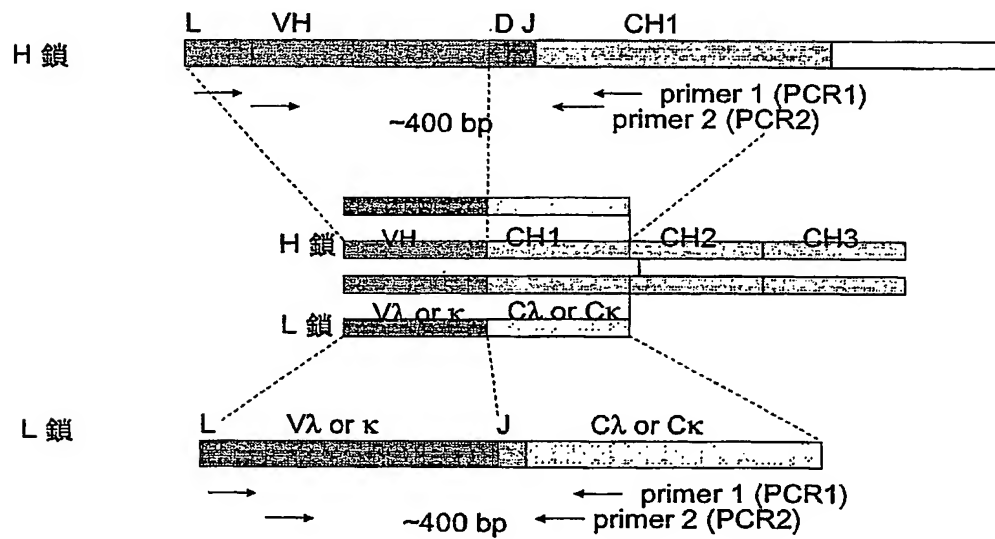
【図 3】

3. B細胞の抗体遺伝子の増幅

抗原特異的B細胞

↓ RT
↓ PCR1
↓ PCR2

抗体の構造



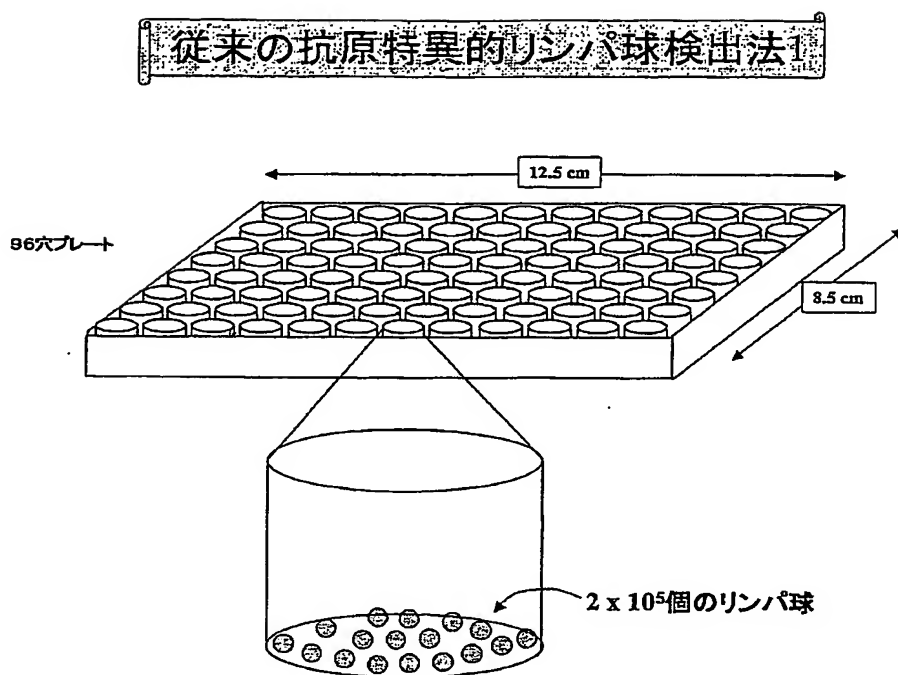
【図 4】

1st: 1 cagtctccagccaccctgtctttgtctccagggc aaagtagccaccctctcctgcnggg 60
|||||
2nd: 55 cagtctccagccaccctgtctttgtctccagggg-aaag-agccaccctctcctgcaggg 112
|||||
1st: 61 ccagtcagagtgttagcancactacttagcctggtagcctccaaacagaaaacactggccaggctccc 120
|||||
2nd: 113 ccagtcagagtgttagcagcactacttagcctggtagcctccaaacagaaaac-ctggccaggctccc 171
|||||
1st: 121 aggctcctnatctatgatgcattctcaacagggccactggcatcccagccagggttaagtgg 180
|||||
2nd: 172 aggctcctcatctatgatgcattc-caacagggccactggcatcccagccacccttcagtgg 230
|||||
1st: 181 cagtgggtctctgggacagacttcaactctcaccatcancagcctagagcctgaagattntgc 240
|||||
2nd: 231 cagtgggtctctgggacagacttcaactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgc 290
|||||
1st: 241 agttnattactgtcancagcgtatcaactggcctctcacttttcggcggaggacccaaggc 300
|||||
2nd: 291 agtttattactgtcagcagcgtagcaactgggtgctcacttttcggcggaggacccaagg- 349
|||||
1st: 301 tggagatcaaaacgaactgtggctgcaccatctgtc 335
|||||
2nd: 350 tggagatcaaaacgaactgtggctgcaccatctgtc 384
|||||

【図 5】

1st: 1	ggtcctgtctcaggtgcagctgcaggcagtcgggcccagtgactggtgaagccttcggag 60
2nd: 48	ggtcctgtcccagctgcagctgcagg-agtcggggcccag-gactggtgaagccttcggag 105
1st: 61	accctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtagtagttactactgg 120
2nd: 106	accctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtagtagttactactgg 165
1st: 121	ggctggatccgccagccccccagggaagggtggagtggtggagtagtatctattatagt 180
2nd: 166	ggctggatccgccagccccccagggaagggtggagtggtggagtagtatctattatagt 225
1st: 181	gggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacgtcc 240
2nd: 226	gggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacgtcc 285
1st: 241	aagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccgcagacacggctgtgtattac 300
2nd: 286	aagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccgcagacacggctgtgtattac 345
1st: 301	tgtgcgagacag 312
2nd: 346	tgtgcgagacag 357

【図 6】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 簡便に特定の抗原に特異的に反応するリンパ球を選択し、この選択された抗原特異的リンパ球から、抗原特異的抗原受容体遺伝子を効率的にクローニングする方法を提供する。クローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子からモノクローナル抗体を製造する方法、及びクローニングされた抗原特異的T細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法を提供する。

【解決手段】 ある抗原に特異的に反応するリンパ球（抗原特異的リンパ球）を1個選択し、次いでこの1個の抗原特異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子をクローニングする方法。抗原特異的リンパ球がBリンパ球である場合、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子がクローニングされ、抗原特異的リンパ球がTリンパ球である場合、抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる。クローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造する方法。クローニングされた抗原特異的T細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 4 6 7 2 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 1 3 2 7 8]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市明輪町 1 - 1 0 8 - 1 3 0 1

氏 名

村口 篤

特願 2 0 0 2 - 3 4 6 7 2 8

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[5 0 2 4 1 3 2 8 9]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 1

氏 名

岸 裕幸

特願 2002-346728

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[395015227]

1. 変更年月日

2001年 9月 8日

[変更理由]

住所変更

住 所

石川県金沢市平和町3-17-14 平和宿舎C58棟13号

氏 名

民谷 栄一

特願 2002-346728

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502345407]

1. 変更年月日

2002年 9月24日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市長江本町18-4-54

氏 名

鈴木 正康